

УДК 577.21; 578.21; 577.27

## ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ, НЕСУЩИХ ЭПИТОПЫ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

А.С. Камзина, А.Ж. Балтабекова, А.В. Шустов

*РГП «Национальный центр биотехнологии» МОН РК, г. Астана, Казахстан  
shustov@biocenter.kz*

Антигены в форме вирусоподобных частиц (VLP) способны вызывать сильный иммунный ответ, вовлекающий как гуморальное, так и клеточное звено. VLP приобрели популярность в качестве платформы для представления иммунной системе антигенных детерминант, заимствованных из огромного разнообразия природных белков, выступающих в качестве мишеней гуморального ответа.

В данном исследовании VLP, образованные коровым белком вируса гепатита В (НВсАg), использованы в качестве носителя эпитопов иммуноглобулина класса Е (IgЕ) человека. Молекулы IgЕ вовлечены в патологический механизм аллергий и бронхиальной астмы. Значение описанных в данной работе антигенов заключается в том, что иммунизация VLP, несущими массив эпитопов IgЕ, потенциально способна вызывать появление антител, блокирующих биологическое действие IgЕ. Таким образом, VLP с эпитопами IgЕ имеют перспективы для использования в составе разрабатываемых терапевтических вакцин для лечения аллергических заболеваний и бронхиальной астмы.

Пептид из константной части IgЕ человека (GETYQSRVTHPHLPRALMRSTTK) клонирован в главной иммунодоминантной области НВсАg с использованием трёх типов линкеров, которые должны обеспечить правильную пространственную укладку эпитопа IgЕ.

Описан эффективный метод наработки и очистки VLP, сформированных рекомбинантным белком НВсАg со встройкой эпитопа IgЕ.

Ключевые слова: астма, антитела, IgЕ, антиген, рекомбинантный, вакцина, вирусоподобная частица.

---

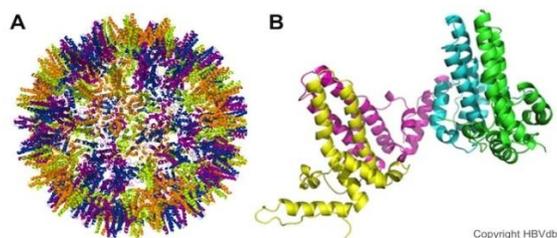
### ВВЕДЕНИЕ

Успехи иммунологии и генетической инженерии в последние десятилетия привели к появлению новых типов вакцин. Вирусоподобные частицы (virus like particles, VLP) становятся всё более популярны для использования в качестве антигенов для вакцин. VLP привлекательны потому, что они иммунологически подобны вирусам и способны вызывать сильный гуморальный иммунный ответ. В отличие от субъединичных вакцин, VLP обладают выраженной способностью активировать цитотоксический ответ, опосредованный Т-лимфоцитами. Отсутствие в VLP вирусного генома означает, что VLP неинфекционны и не создают проблем с безопасностью, присущих вакцинам, содержащим живые ослабленные возбудители.

Структурное подобие вирусам означает, что VLP – это макромолекулярные структуры, имеющие множественные оси вращательной симметрии и состоящие из одинаковых субъединиц, расположенных упорядоченным образом, в соответствии с определённым типом пространственной укладки. Природные VLP часто образуются в качестве побочного продукта репликации некоторых вирусов. Искусственные VLP можно получать *in vitro* посредством ассоциации вирусных структурных белков. Рекомбинантные структурные белки ряда вирусов обладают способностью к спонтанной самосборке в VLP, причём эта способность сохраняется в гетерологичных системах экспрессии [1]. VLP – это не только вирусные иммуногены, VLP могут выступать в качестве носителей антигенных детерминант, представленных огромным разнообразием природных белков, включая поверхностные белки бактерий или паразитов, онкомаркёры и аутоантигены. Технология VLP стала популярной, и VLP приобрели особое значение для разработки вакцин в связи с тем обстоятельством, что представление антигенов иммунной системе в виде упорядоченных массивов эпитопов значительно (в некоторых случаях в тысячи раз!) увеличивает иммуногенность этих эпитопов и даже позволяет вызывать появление антител против собственных белков организма (аутоантигенов) [2].

Среди белков, имеющих наиболее долгую историю использования в качестве рекомбинантных белков-носителей (backbone), формирующих VLP, является коровый белок вируса гепатита В (НВсАg) [3]. Молекулы НВсАg образуют стабильные димеры, которые ассоциируют с образованием сферических VLP (рис. 1).

HBsAg формирует частицы двух типов: T3 частицы состоят из 90 димеров, T4 частицы состоят из 120 димеров.



**Рис. 1.** А. 3D структуры вирусоподобной частицы HBsAg и В. субъединицы, сформированные димерами молекул HBsAg

[рисунок из <http://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/HBVdbProteins?protein=Core>]

Пространственная укладка молекулы HBsAg допускает возможность встройки в молекулу длинных пептидов из неродственных источников (гетерологичных вставок) и даже полноразмерных функционально активных белков (например, зеленого флуоресцентного белка GFP длиной 230 а.о.), таким образом, что вставка не нарушает способность субъединиц к самосборке в VLP. Наиболее привлекательной областью HBsAg для вставки гетерологичных эпитопов является расположенный по центру последовательности HBsAg т.н. главный иммунодоминантный район (MIR). Гетерологичные аминокислотные последовательности, встроенные в домен MIR, оказываются расположенными на внешней поверхности VLP и доступны для распознавания антителами. Домен MIR допускает очень протяжённые гетерологичные вставки. Среди примеров успешной самосборки VLP из HBsAg со вставками в домен MIR описано получение VLP, несущих на поверхности 180 или 240 молекул GFP [4]. Для уменьшения взаимного влияния пространственных укладок белка-носителя и гетерологичных вставок, последние снабжают гибкими линкерами (последовательности длиной 5-20 аа, богатые глицином и серином).

Рекомбинантный HBsAg можно эффективно получать в бактериальных штаммах-продуцентах, с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Мировые биотехнологические компании активно используют преимущества VLP, сформированных из рекомбинантного HBsAg, для разработки вакцин против огромного разнообразия иммунологических мишеней [3, 5, 6].

Бронхиальная астма (БА) является глобальной проблемой. В мире 235 миллионов людей всех возрастов болеют БА (по данным ВОЗ, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>). БА является хроническим воспалительным обструктивным заболеванием дыхательных путей, характерным признаком которого является бронхиальная гиперактивность по отношению к присутствующим во вдыхаемом воздухе аллергенам. Патологический механизм БА включает гиперпродукцию антител класса E (IgE) в слизистой оболочке бронхов. У больных БА антитела IgE присутствуют в патологически высоких концентрациях в слизистой в свободном виде, а также с высокой плотностью представлены на плазматических мембранах тучных клеток и базофилов - главных клеточных эффекторов аллергического ответа. Взаимодействие специфических IgE на мембранах клеток-эффекторов с поливалентным аллергеном приводит к сшиванию мембранных рецепторов (FcεRI), что активирует эффекторные клетки. Развитие астматического приступа непосредственно вызвано высвобождением из активированных тучных клеток и базофилов низкомолекулярных медиаторов воспаления (гистамин и др.). В соответствии с патологическим механизмом иммуноглобулины IgE являются привлекательной мишенью для создания терапевтических вакцин против БА [2]. Возможность блокирования IgE для борьбы с приступами БА подтверждена клинической эффективностью противоастматического препарата Omalizumab (торговое название Xolair, патентообладатель – компания Genentech). Omalizumab представляет собой рекомбинантное моноклональное антитело против человеческих IgE [7-9]. Omalizumab с высокой аффинностью связывается с IgE в области Fc и ингибирует связывание IgE с мембранным рецептором.

Альтернативным подходом для лечения астмы и аллергии является индукция синтеза в организме пациента эндогенных антител IgG, блокирующих биологические эффекты IgE путем связывания с Fc фрагментом. Для этого разрабатываются терапевтические вакцины [10]. Проблемы в разработке таких вакцин заключаются в низкой иммуногенности IgE, который является аутоантигеном, а также необходимость нацеливать гуморальный ответ на отобранные эпитопы IgE. Вакцина должна вызывать появление IgG, которые связываются с IgE человека, тем самым блокируя взаимодействие IgE с рецептором FcεRI. При этом не должно происходить кросс-сшивки мембранных комплексов IgE-FcεRI. Молекулы IgE взаимодействуют с

рецептором FcεRI посредством нескольких участков в иммуноглобулиновых доменах константной части Cε2, Cε3 и Cε4 [11]. Целевые эпитопы имеют преимущественно конформационную природу, что дополнительно осложняет разработку рекомбинантных антигенов для их презентации. Для перспективной вакцины против БА важно найти фрагменты последовательности IgE, которые приобретают правильную конформацию на поверхности VLP.

В статье [12] описано использование в качестве антигена 23-членного пептида, имеющего последовательность GETYQSRVTHPHLPRALMRSTTK. Данный пептид гомологичен району 413-435 а.о. последовательности домена Cε3 константной части IgE человека. Антиген на основе указанного пептида способен индуцировать синтез поликлональных сайт-специфических антител анти-IgE [12]. Вакцинация экспериментальных животных описанным пептидом, слитым с Th-эпитопом, блокирует выброс гистамина сенситизированными базофилами, снижает ответ в тесте пассивной кожной анафилаксии. У лабораторных животных, иммунизированных данным антигеном, значительно снижаются уровни сывороточного IgE [12]. При этом антитела анти-IgE против данного пептида не обладают собственным анафилактическим действием [12].

В этой работе мы описываем метод получения трёх различных вариантов VLP антигенов, представляющих на поверхности массив эпитопов IgE человека, перспективных для создания вакцин против БА.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Бактериальные штаммы*

Работы по клонированию выполнены с использованием штаммов JM109 и XLBlue. Продукцию рекомбинантных белков осуществляли в штамме BL21 (DE3) (Novagen). Для всех работ использовали среду LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl).

### *Использованные гены и генноинженерные конструкции*

Генноинженерные работы проводили с использованием методов, описанных в [13]. В работе использовали ген HBcAg без вставок в домен MIR (конструкция E5), а также три варианта гена HBcAg/IgE, которые несут гетерологичные вставки в домен MIR (конструкции E10, E11, E12). Гетерологичные вставки состоят из фрагмента последовательности IgE человека, фланкированного линкерами. Последовательность эпитопа IgE, выбранного для встройки в антиген HBcAg/IgE, описана в [12]. Указанный пептид длиной 23 а.о. из Cε3 домена IgE был иммуногенен в аутологическом виде экспериментальных животных и способен вызывать появление антител, блокирующих взаимодействие IgE с рецептором [12].

Конструкции E10, E11, E12 различаются последовательностями линкеров (таблица 1). Гены HBcAg и HBcAg/IgE получены методом синтеза *de novo* из протяжённых олигонуклеотидов. Последовательности указанных генов кодон-оптимизированы для экспрессии в *E. coli*.

**Таблица 1.** Рекомбинантные антигены HBcAg и HBcAg/IgE

Обозначение	Описание	Аминокислотная последовательность вставки в домен MIR
Eр	Эпитоп IgE человека	GETYQSRVTHPHLPRALMRSTTK
E5	HBcAg без вставки в MIR	без вставки
E10	HBcAg/IgE, линкеры содержат остатки Cys, фланкирующие эпитоп	GGGGEESGGGGTC - Eр - CTGGGGSEEGGGG
E11	HBcAg/IgE, линкеры не содержат остатков Cys	GGGGEESGGGGT - Eр - TGGGGSEEGGGG
E12	HBcAg/IgE, линкеры содержат последовательности “триптофановой молнии”	GGGGEESGGGGKAWTHDWTWNP- Eр – GKWTWLWRKNTGGGGSEEGGGG

Для создания экспрессирующих конструкций использован вектор pET22/28 из лабораторной коллекции. Для получения вектора pET22/28 из плазмиды pET28c (Novagen) путём гидролиза рестриктазами XhoI и XbaI вырезали фрагмент, содержащий участок посадки рибосом и полилинкер. Полученный фрагмент клонировали по указанным сайтам в плазмиду pET22b(+) (Novagen). Подобно pET22b(+), вектор для

бактериальной экспрессии рЕТ22/28 кодирует резистентность к антибиотику ампициллину, но имеет полилинкер, аналогичный таковому в плазмиде рЕТ28с.

Встройку генов целевых белков НВсAg и НВсAg/IgE проводили в рЕТ22/28 по сайтам NcoI и EcoRI; при этом трансляция указанных генов начинается с кодона ATG, входящего в состав сайта NcoI.

#### *Обработка культур штаммов-продуцентов*

Колонии штамма BL21 (DE3), трансформированного конструкциями E5, E10, E11, или E12, инокулировали в накопительные культуры объемом 5 мл (LB, 100 мкг/мл ампициллин) и инкубировали в течение ночи при 37°C, с перемешиванием на скорости 150-180 об/мин. На следующий день ночные культуры переносили в 300 мл среды LB (100 мкг/мл ампициллин) и выращивали при 37°C до достижения OD<sub>600</sub> 0,7-0,9. Экспрессию рекомбинантного белка индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 1 mM. После добавления индуктора культуры инкубировали в течение 6 ч при 37°C, с перемешиванием при 120 об/мин.

После низкоскоростного центрифугирования получали в среднем 2 г биомассы клеток штамма-продуцента. Биомассу ресуспендировали в 20 мл буфера TNE (10 мМТрис pH 7,5, 1 мМ EDTA, 100 мМ NaCl). Клетки разрушали обработкой ультразвуком: делали 30 пульсов по 1 мин с максимальной амплитудой, между пульсами делали перерывы по 1 мин. Цитозольную фракцию получали путём центрифугирования гомогената при 10000 об/мин в течение 30 мин, при 4°C. Супернатант использовали для выделения рекомбинантных антигенов из цитозольной фракции. Осадок использовали для выделения рекомбинантных антигенов из нерастворимого материала (тельца включения и пр.).

#### *Очистка рекомбинантных антигенов из цитозольной фракции*

Цитозольную фракцию фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм и наносили на колонку для металлоаффинной хроматографии HisTrap Chelating 1 ml (GE Healthcare), насыщенную ионами Ni<sup>2+</sup>. Рекомбинантные антигены элюировали с колонки путём промывки буферами с градиентом имидазола в диапазоне от 20 мМ - 500 мМ, на скорости потока 0,5 мл/мин. Собирали фракции объёмом 0,5 мл. Для проведения хроматографической очистки использовали систему FPLC АКТА Purifier 10 (GE Healthcare).

#### *Очистка рекомбинантных антигенов из нерастворимого материала*

Разработан метод двухраундовой хроматографической очистки антигенов, экстрагированных из нерастворимого материала. Осадок, полученный после отделения цитозольной фракции, ресуспендировали в 10 мл буфера А с мочевиной (20 мМ Hepes pH 7.6, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 3 М мочевины) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с перемешиванием при 50-70 об/мин. Солюбилизатор осветляли низкоскоростным центрифугированием и собирали супернатант, который фильтровали, как описано выше. Белок, экстрагированный в 3М мочевины, подвергали первому раунду хроматографической очистки, который проводили в денатурирующих условиях. Для этого белок адсорбировали на колонку HisTrap Chelating 1 ml насыщенную ионами Ni<sup>2+</sup> и уравновешенную буфером А с мочевиной. Элюцию градиентом имидазола проводили как описано выше с тем исключением, что в буферы для элюции добавляли мочевины до 3М. Элюат, выходящий из колонки, фракционировали; собирали 5 мл элюата, соответствующих пику поглощения на длине 280 нм. К указанному образцу добавляли 45 мл раствора NaCl 150 мМ и оставляли образец при комнатной температуре на ~12 ч для самосборки VLP и выпадения в осадок примесей. После этого образец осветляли центрифугированием и подвергали второму раунду металлоаффинной хроматографии в не денатурирующих условиях. На втором раунде хроматографии использовали буферы без мочевины. Фракции, полученные в результате второго раунда хроматографии и содержащие рекомбинантный белок, объединяли. Образцы концентрировали. Для этого рекомбинантный антиген осаждали сульфатом аммония (40%), осадок растворяли в 1 мл буфера ФСБ. Анализ чистоты рекомбинантных антигенов проводили с помощью SDS-PAGE.

#### *Ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы*

Дальнейшую очистку VLP от примесей, в частности, от димеров молекул рекомбинантного антигена, не включившихся в состав VLP, проводили с помощью изопикнического центрифугирования в ступенчатых градиентах плотности сахарозы (Beckman). Для этого в пробирки для ротора SW-41 объёмом 13 мл наслаивали растворы сахарозы с концентрациями (w/w) 60, 50, 40 и 30%. Наслаивали следующие объёмы: по 2 мл 60 и 50% растворов, по 3,5 мл 40 и 30% растворов. Растворы сахарозы готовили на буфере TBS-T (20 мМ Трис pH 7,6, 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100). Концентрированный раствор белка наслаивали поверх 30%

раствора сахарозы. Пробирки упаковывали в ротор и подвергали центрифугированию при 35000 об/мин, 4°C, в течение 10-14 часов. По завершении ультрацентрифугирования градиенты со сформировавшимся распределением частиц по плотности фракционировали по 1 мл. Распределение содержания белка вдоль градиента исследовали путём определения содержания белка во фракциях по Бредфорду. Для подтверждения молекулярных масс рекомбинантных белков в мономерной форме использовали электрофорез в денатурирующих условиях SDS-PAGE.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Структуры созданных рекомбинантных антигенов*

Рекомбинантный НВсAg может быть произведён в различных системах экспрессии без существенного влияния на способность к образованию VLP. В данном исследовании были созданы генетические конструкции для синтеза рекомбинантного НВсAg в клетках *E.coli*. Все использованные в работе рекомбинантные белки несут на N-конце гексагистидиновую метку (N6His), а на C-конце имеют последовательность, которая стабилизирует VLP путём образования дисульфидных связей между капсомерами (т.н. последовательность НуW2, описана в [14]) (рис. 2).

А 5'-

```
ccATGgggcatcatcaccatcactcaggtggatggatattgaccctacaagagtttgggccacagttgagctcttaagtttctg  
ccgagtgattttttccatcagtcctgggacctgttagatcacgctcagctctgtatcgtgaggctcttgagtcaccggaacattgagccccc  
catcacacggcactgcgtcaagcgatcctgtgtggggggagctgatgacctggccactgggtcgggtaaatctcaggaccaccagc  
atctagagatctcgtggtagattgtgaataccaacatgggtctgaagtttcgtagcttctctggttcatatcagctgcctgacattcgcc  
gggaaacggcatagaatatttagtcagttttggggttgattcgtactccgccgcatatcgtccgcccaacgcacatcctaagtaacatt  
accgaaacgacagttgttggcggggggggtccctcccagctctctctcagtcacagcgaattgcTAAAgcttgaattc-3'
```

В MGHHHHHHSGGMDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPVSRDLLDTASALYREALSPENC  
SPHHTALRQAILCWGELMTLATWVGVNLEDPASRDLVVSIVNTNMGLKFRQLLWFHI  
SCLTFGRETVEIYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVAAGRSPSQSPSQSSANC

А - нуклеотидная последовательность гена НВсAg. Стартовый кодон и стоп-кодон TAA показаны прописными буквами, сайты рестриктаз NcoI, HindIII и EcoRI подчёркнуты; В - последовательность белка НВсAg. Подчёркнуты N-концевая гексагистидиновая метка (N6His) и C-концевая последовательность, стабилизирующая вирусоподобные частицы (НуW2).

**Рис. 2.** Последовательности гена НВсAg и его продукта экспрессии

В данной работе синтезированы три различных варианта антигена НВсAg/IgE, который несёт вставки эпитопа IgE (таблица 1). Гетерологичные последовательности встроены в НВсAg между аминокислотными остатками Asp78 и Ser81 (положения указаны по последовательности природного НВсAg). Два аминокислотных остатка (Pro79 и Ala80), которые в НВсAg образуют поворот на вершине шпильки домена MIR удалены из НВсAg/IgE.

Антигены НВсAg/IgE, закодированные в конструкциях E10, E11, E12, различаются последовательностями линкеров, фланкирующих эпитоп IgE (рис. 3). Выбранный для встройки эпитоп в молекуле IgE образует особую пространственную структуру, называемую бета-шпилькой (эта укладка подобна конформации бета-складчатого листа). В природной конформации N- и C-концы эпитопа пространственно сближены. Антиген E10 несёт эпитоп, фланкированный остатками цистеина (рис. 3). Идея создания данного рекомбинантного белка заключается в том, чтобы в условиях окислительного рефолдинга очищенного антигена E10 добиться образования дисульфидной связи между указанными остатками цистеина и, таким образом, гарантировать пространственную близость концов эпитопа IgE и заблокировать его в нужной конформации. Антиген E11 аналогичен по аминокислотной последовательности E10, но в E11 эпитоп не фланкирован остатками цистеина. В антигене E12 использован другой подход для обеспечения пространственной близости концов эпитопа. В E12 эпитоп фланкирован последовательностями коротких

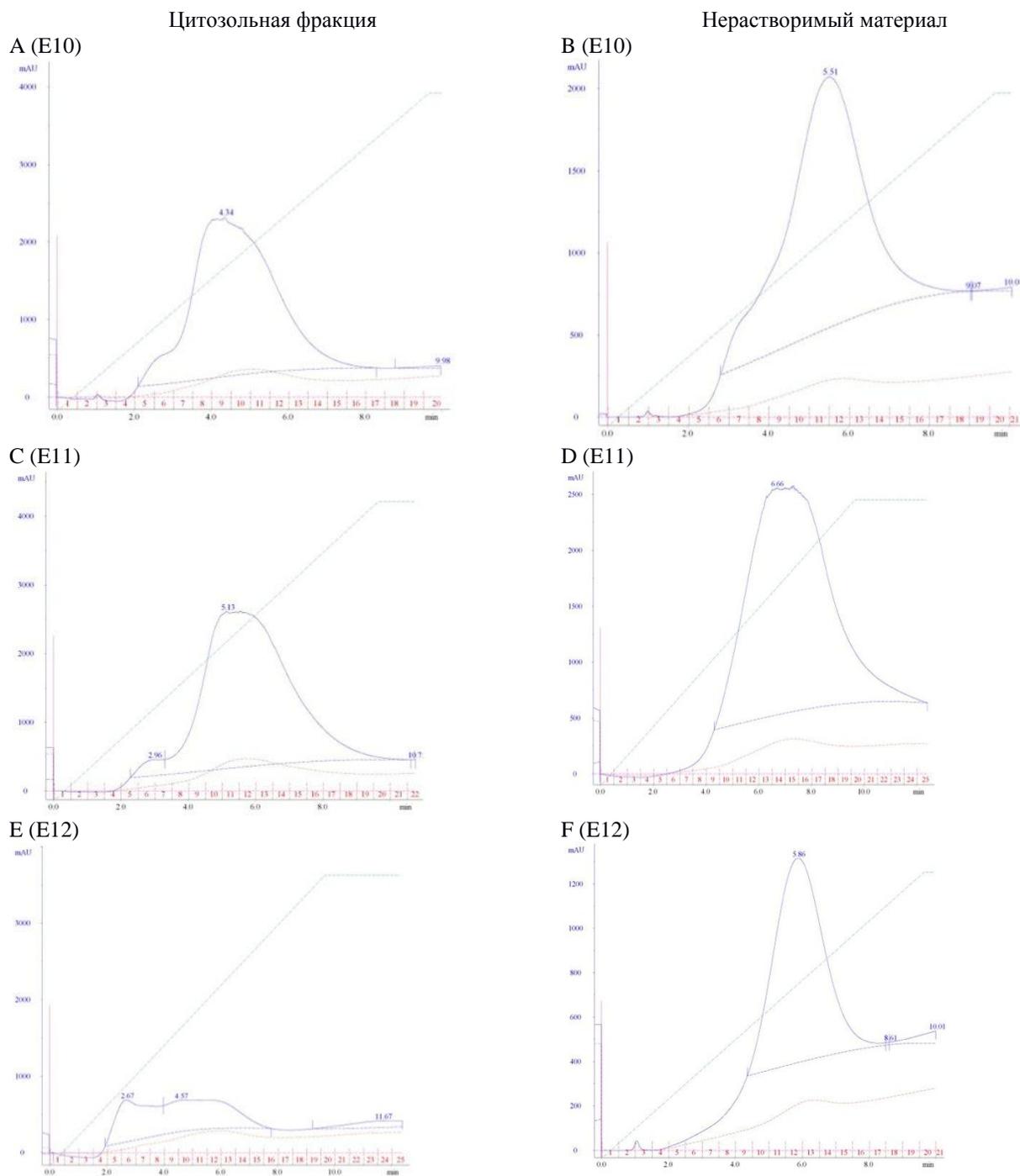
пептидов, которые ассоциируют друг с другом с образованием растворимого комплекса называемого «триптофановой молнией» (tryptophan zipper). В этом комплексе образующие его пептиды ориентированы голова-к-хвосту и имеют конформацию антипараллельного бета-складчатого листа [15]. Наше предположение заключалось в том, что в E12 также будет происходить образование «триптофановой молнии» из пептидов, фланкирующих эпитоп, и образованный комплекс будет «навязывать» бета-конформацию эпитопу.

```
HBcAg_E5      : NLEDP-----ASRDL
HBcAgIge_E10 : NLEDGGGGGEESSGGGGT-----CGETYQSRVTHPHLPRALMRSTTKC-----TGGGGSEEGGGSRDL
HBcAgIge_E11 : NLEDGGGGGEESSGGGGT-----CGETYQSRVTHPHLPRALMRSTTK-----TGGGGSEEGGGSRDL
HBcAgIge_E12 : NLEDGGGGGEESSGGGGKAWTHDWTWNPGETYQSRVTHPHLPRALMRSTTKGKWTWLWRKNKTGGGGSEEGGGSRDL
                NLEDggggeesgggg          getyqsrvtphlpralmrsttk          tggggseegggSRDL
```

**Рис. 3.** Сравнение фрагментов HBcAg и HBcAg/IgE, соответствующих центральной области главного иммунодоминантного района MIR

*Результаты очистки рекомбинантных антигенов из культур штаммов-продуцентов*

Мониторинг процесса хроматографии с использованием системы FPLC показал, что антигены HBcAg/IgE элюируются с металлоаффинного сорбента в одном и том же диапазоне концентраций имидазола (250-300 мМ), не зависимо от того, выделен рекомбинантный белок из растворимой или нерастворимой фракции (рис. 4).



**Рис. 4.** Результаты очистки с использованием металлоаффинной хроматографии антигенов HBsAg/IgE из цитозольной фракции и из нерастворимого материала

В количественном отношении продукция рекомбинантных белков примерно одинакова для разных конструкций за исключением E12, которая в серии экспериментов демонстрировала сниженный выход (таблица 2). Антиген E5 (HBsAg) обнаруживался практически только в цитозольной фракции, поэтому

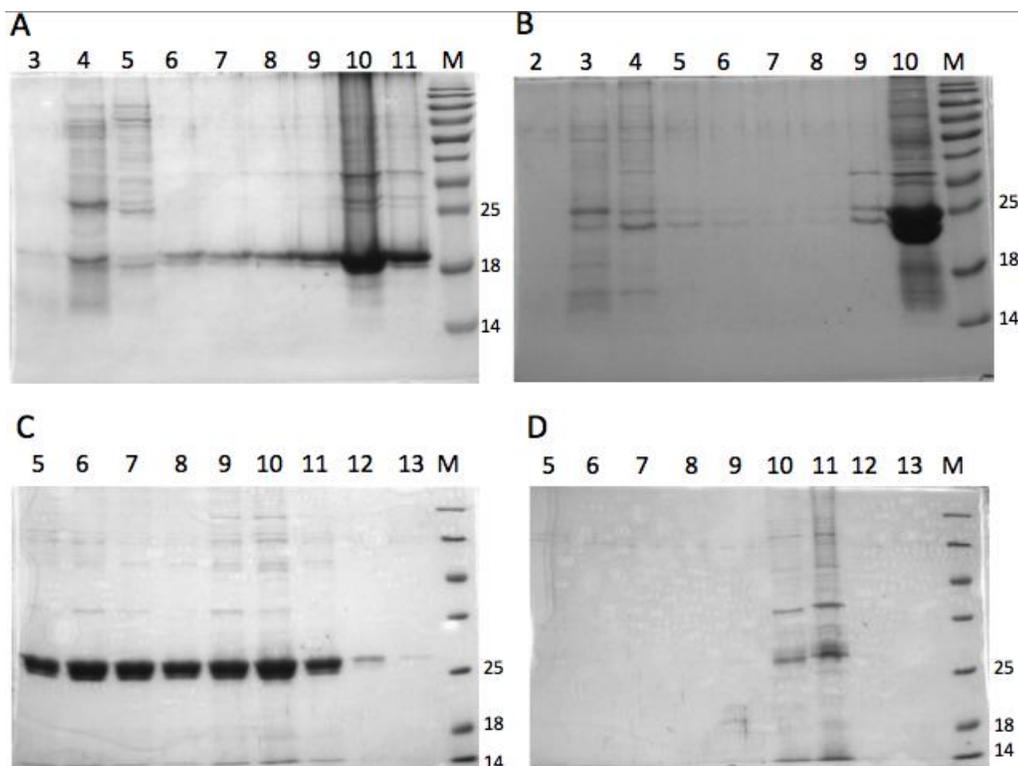
попыток выделения E5 из нерастворимого материала не предпринимали. Гомогенаты штаммов-продуцентов НВсAg/IgE содержали рекомбинантный белок как в цитозольной, так и в нерастворимой фракциях. Выходы рекомбинантных белков из растворимой и нерастворимой фракций были примерно одинаковы, за исключением E12.

**Таблица 2.** Выход рекомбинантных антигенов с 300 мл индуцированной культуры

Антиген	Источник	Выход, мг
E5	Цитозоль	5,1
E10	Цитозоль	4,1
E10	Нераств. материал	3,5
E11	Цитозоль	5,8
E11	Нераств. материал	6,9
E12	Цитозоль	1,5
E12	Нераств. материал	0,8

*Анализ выделенных антигенов с помощью градиентного ультрацентрифугирования*

Проводя это исследование, мы обнаружили, что НВсAg в растворах без добавления стабилизаторов склонен к агрегации с образованием преципитатов, в особенности при хранении. Мы также обнаружили, что добавление в растворы НВсAg глицерина до 40% (v/v) существенно подавляет агрегацию. Чтобы избежать агрегации в процессе ультрацентрифугирования, растворы сахарозы готовили с добавлением 1% Triton X-100. В препараты антигена добавляли 40% глицерина и препараты обрабатывали ультразвуком, до осветления. Полученные пробы наносили на преформированные ступенчатые градиенты и подвергали ультрацентрифугированию. Установившиеся градиенты разделяли на фракции, аккуратно отбирая пробы по 1 мл, начиная сверху градиента. Таким образом, объём пробирки разделяли на 13 фракций. Содержание белка и белковый состав полученных фракций исследовали методом SDS-PAGE. Распределение содержания белка вдоль градиента оказалось неодинаковым для разных антигенов (рис. 5). При исследовании методом ультрацентрифугирования в градиенте антигенов E5, E10 и E12 большая часть белка обнаруживается во фракциях №10-11. Фракции №10-11 имеют плотность 1,2-1,25 г/мл, что соответствует известной плотности VLP сформированных НВсAg [16].



Увеличение номера фракции соответствует росту плотности раствора сахарозы. Номер фракции приведён над фотографией геля. Панели рисунка представляют результаты исследования следующих антигенов: А, Е5; В, Е10; С, Е11; D, Е12

**Рис. 5.** Распределение антигенов по плотности в градиентах сахарозы 20-60%

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании представлены антигены, потенциально способные вызывать появление антител против выбранного эпитопа IgE человека. Антигены, представляющие эпитопы IgE, привлекают большое внимание в связи с попытками создать терапевтическую вакцину против аллергии и аллергической бронхиальной астмы, т.е. заболеваний, патологический механизм которых требует участия IgE. В данной работе представлен дизайн рекомбинантных белков, способных образовывать вирусоподобные частицы, особым свойством которых является высокая иммуногенность. Описан метод выделения рекомбинантных антигенов из культур бактериальных штаммов-продуцентов. Получаемые антигены гомогенны по белковому составу и имеют плавучие плотности в градиентах сахарозы, ожидаемые для вирусоподобных частиц.

Работа поддержана грантом №055 по бюджетной программе Министерства образования и науки РК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Johnson J.E., Chiu W. (2000). Structure of virus and virus-like particles. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 229-235.
2. Bachmann M.F., Rohrer U.H., Kundig T.M., Burki K., Hengartner H., Zinkernagel R.M. (1993). The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262, 1448-1451.
3. Whitacre D.C., Lee B.O. & Milich D.R. (2009). Use of hepadnavirus core proteins as vaccine platforms. *Expert Rev Vaccines* 8, 1565-1573.
4. Kratz P., Bottcher B., Nassal M. (1999). Native Display of Complete Foreign Protein Domains on the Surface of Hepatitis B Virus Capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 1915-1920.
5. Arora U., Tyagi P., Swaminathan S., Khanna N. (2012). Chimeric Hepatitis B core antigen virus-like particles displaying the envelope domain III of dengue virus type 2. *J Nanobiotech* 10:30.
6. Jennings G.T., Bachmann M.F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol. Chem., Vol.* 389, 521-536.

7. Holgate S., Smith N., Massanari M. & Jimenez P. (2009). Effects of omalizumab on markers of inflammation in patients with allergic asthma. *Allergy* 64, 1728-1736.
8. Sarinho E. & Cruz A.A. (2006). Anti-IgE monoclonal antibody for the treatment of the asthma and other manifestations related to allergic diseases. *J Pediatr (Rio J)* 82, S.127-32.
9. D'Amato G., Piccolo A., Salzillo A., Noschese P., D'Amato M. & Liccardi G. (2007). A recombinant humanized anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) in the therapy of moderate-to-severe allergic asthma. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 1, 225-231.
10. Peng Z. (2009). Vaccines targeting IgE in the treatment of asthma and allergy. *Hum Vaccin* 5, 302-309.
11. Hunt J., Bracher M.G., Shi J., Fleury S., Dombrowicz D., Gould H.J., Sutton B.J. & Bevil A. J. (2008). Attenuation of IgE affinity for FcεRI radically reduces the allergic response in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 283, 29882-29887.
12. Wang C.Y., Walfield A.M., Fang X., Hammerberg B., Ye J., Li M.L. / Synthetic IgE peptide vaccine for immunotherapy of allergy // *Vaccine*. – 2003. – Vol.21. – P.1580-1590.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* // Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. - 1987. – 969 p.
14. Billaud J.N., Peterson D., Barr M., Chen A., Sallberg M., Garduno F., Goldstein P., McDowell W., Hughes J., Jones J., Milich D. (2005). Combinatorial approach to hepadnavirus-like particle vaccine design. *J Virol.*; 79(21): 13656–13666.
15. Cheng Z. & Campbell R.E. (2009). An engineered tryptophan zipper-type peptide as a molecular recognition scaffold. *J of PeptSci*; 15:523-532.
16. Koletzki D., Zankl A., Gelderblom H.R., Meisel H., Dislers A., Borisova G., Pumpens P., Kruger D.H., Ulrich R. (1997). Mosaic hepatitis B virus core particles allow insertion of extended foreign protein segments. *J Gen Virol* 78, 2049-2053.

## АДАМ ИММУНОГЛОБУЛИНИНІНІҢ ЭПИТОПТАРЫН ТАСЫМАЛДАЙТЫН ВИРУС ТӘРІЗДІ БӨЛШЕКТЕРДІ АЛУДЫҢ ТИІМДІ ӘДІСІ

А.С. Қамзина, А.Ж. Балтабекова, А.В. Шустов

Ұлттық биотехнология орталығы, Астана қаласы, Қазақстан

### ТҮЙІН

Вирустың құрылымдық ақуыздарының негізінде жасалған вирус тәрізді бөлшектер (ВТБ) антигеннің құрылымына және тіпті вирустық бөлшектің морфологиясына да еліктей алады. Сондықтан ВТБ антигендері күшті иммундық жауапты тудырады.

Дамыған елдерде аллергиялық тыныс демікпесі аса кең таралған созылмалы аурулардың бірі болып табылады. Бұл мақалада НВсAg-мен түзілген және адамның IgE эпитоптарын тасымалдайтын ВТБ тыныс демікпесін емдеуге арналған терапиялық вакцина ретінде қолдануға бағытталған зерттеудің нәтижелері көрсетілген.

Адам IgE'сінің тұрақты пептид бөлігі (GETYQSRVTNPHLPRALMRSTTK) НВсAg'нің иммунодоминантты аймағына үш түрлі линкермен клондалынды. Бұл линкерлер IgE эпитопының дұрыс пішінін сақтап қалуын қамтамасыз етеді.

Эффективті ВТБ экспрессиясы және тазалау протоколы көрсетілген.

**Кілтті сөздер:** демікпе, антиденелер, IgE, антиген, рекомбинантты, вакцина, вирус тәрізді бөлшек.

## AN EFFECTIVE METHOD FOR PRODUCTION OF VIRUS-LIKE PARTICLES, CARRYING HUMAN IMMUNOGLOBULIN EPITOPES

A.S. Kamzina, A. Zh. Baltabekova, A.V. Shustov

National Center for Biotechnology, Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Astana, Kazakhstan

shustov@biocenter.kz

### SUMMARY

Antigens in the form of virus-like particles (VLP) are capable of eliciting a strong humoral and cellular immune response. VLP gained popularity as a platform for the presentation of antigenic determinants of the immune system, borrowed from a huge variety of natural proteins that act as targets of the humoral response.

In this study, VLP, formed by the core protein of hepatitis B virus (HBcAg), used as a carrier of human immunoglobulin E (IgE) epitope. IgE molecules are involved in the pathological mechanism of allergies and asthma. The value of the antigens described in this work is that immunization of VLP, carrying an array of IgE epitopes, is potentially capable of eliciting antibodies that block the biological effect of IgE. Thus, VLP with IgE epitopes are promising for use in therapeutic vaccine developed for the treatment of allergic diseases and bronchial asthma.

The peptide of the constant portion of the human IgE (GETYQSRVTHPHLPRALMRSTTK) has been cloned into the main HBcAg immunodominant region using three types of linkers, which should provide the correct spatial arrangement of IgE epitope.

An efficient method of expression and purification of VLP forming recombinant protein is described.

**Keywords:** asthma, antibodies, IgE, antigen, recombinant, vaccine, virus-like particle.